

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08166

研究課題名(和文) 生体外増幅培養した血管内皮前駆細胞による肺高血圧症の血管内皮機能再生の試み

研究課題名(英文) Regeneration of vascular endothelial function in pulmonary hypertension by ex vivo amplified and cultured vascular endothelial progenitor cells

研究代表者

長岡 鉄太郎 (NAGAOKA, TETSUTARO)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：70407295

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：生体外増幅培養した末梢血単核球(MNC-QQc)の血管内投与によって、肺動脈性肺高血圧症(PAH)ラットの肺循環動態と血管リモデリングが改善した。ドナーから採取したMNC-QQcはレシピエントPAHラットの肺組織間質に定着しており、その多くはM2マクロファージであった。MNC-QQcからM2マクロファージを除去するとPAH改善効果は消失した。肺組織の網羅的遺伝子解析では、MNC-QQcは炎症関連遺伝子の発現を抑制しており、さらにM2マクロファージがTACR-1遺伝子の発現を制御していた。MNC-QQcがTACR-1を介した炎症抑制によってPAHの病態を改善している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

各種肺血管拡張薬の開発によってPAHの予後は劇的に改善したが、強い血管内皮細胞障害と血管リモデリングを有する治療抵抗性の重症PAHでは、肺移植以外に有効な治療手段がないのが現状である。本研究では、単発のMNC-QQc投与でPAHラットの肺循環動態に加えて肺動脈リモデリングが改善しており、肺血管拡張薬にはない抗リモデリング効果を有する新規治療としても期待される。細胞移植という、これまでにない発想のPAH治療コンセプトであり、特に重症例に対する治療戦略を大きく変える可能性を含む研究成果と考えている。

研究成果の概要(英文)：Intravascular administration of ex vivo amplified cultured peripheral blood mononuclear cells (MNC-QQc) improved pulmonary circulation and vascular remodeling in pulmonary arterial hypertension (PAH) rats. MNC-QQc from donors settled in the lung tissue stroma of recipient PAH rats, mostly M2 macrophages. Furthermore, removal of M2 macrophages from MNC-QQc abolished the PAH ameliorating effect. Comprehensive genetic analysis of whole lung tissue revealed that MNC-QQc suppressed the expression of inflammation-related genes, especially TACR-1 gene expression was suppressed by M2 macrophages. TACR-1 is expressed on the neurokinin-1 receptor (NK-1R), which triggers inflammation. These results suggest that MNC-QQc may contribute to the control of PAH progression via suppressing NK-1R related inflammation.

研究分野：肺循環障害

キーワード：肺動脈性肺高血圧症 生体外増幅培養 末梢血単核球 マクロファージ 血管内皮前駆細胞 細胞移植

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肺動脈性肺高血圧症 (**pulmonary arterial hypertension : PAH**) の主病態は、血管内皮細胞機能障害に伴う肺動脈の異常収縮と、肺動脈局所の炎症に伴う血管リモデリングである。**PAH** の病態には、血管内皮細胞を由来とする血管弛緩因子の一酸化窒素・プロスタサイクリンと血管収縮因子のエンドセリン-1 が関与し、近年これらの因子を標的とした多くの肺血管拡張薬が開発され、**PAH** の予後は著しく改善した。一方で、血管リモデリングの進行した治療抵抗性 **PAH** では血管内皮機能は著しく低下し、血管局所への強い炎症細胞浸潤が予想されるが、現行の **PAH** 治療薬は血管拡張が主な薬理作用であり、血管内皮機能の回復や強力な抗炎症作用は期待できない。

1997 年、ヒト成人末梢血から採取した骨髓由来細胞の中に、血管内皮細胞と同様の表面マーカーを発現する細胞が含まれることが示され、血管内皮前駆細胞 (**endothelial progenitor cells : EPC**) と命名された。**EPC** は末梢血中の単核球成として存在し、血管の修復や新生に重要な役割を果たすことが報告され (**Asahara et al. Science. 1997**) **EPC** を用いた血管再生治療が注目を集めてきた。例えば、虚血病変における新生血管の亢進や (**Kalka et al. PNAS. 2000**)、心筋梗塞の虚血心筋における新生血管増も報告されている (**Kawamoto et al. Circulation. 2003**)。 **PAH** においても、肺血流動態悪化や炎症性サイトカイン増加と **EPC** 減少が有意に逆相関し (**Diller et al. Circulation. 2008, Garcia-Lucio et al. Int J Cardiol. 2016**)、肺高血圧症ラットに対する **EPC** 移植治療の有効性も示された (**Yip et al. Crit Care Med. 2008**)。一方、**PAH** の病態における **EPC** の関与に懐疑的な報告もされており (**Mirsky et al. AJP Lung. 2011, Nijmeh et al. AJP Lung. 2014**) 更なる検証が必要である。そこで申請者は、治療抵抗性 **PAH** を標的とした **EPC** を用いた血管内皮機能修復治療の確立を目指し、本研究を計画した。

2. 研究の目的

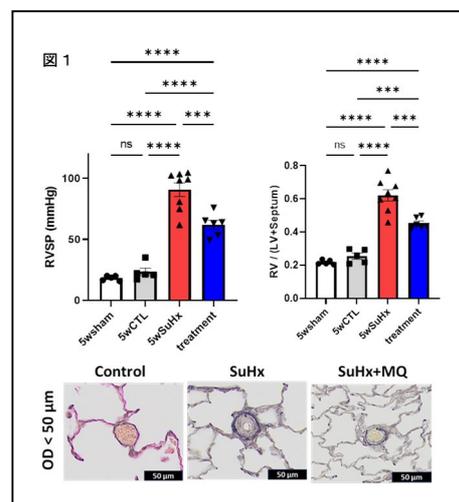
2012 年に、末梢血から回収した単核系細胞 (**mononuclear cells: MNC**) 中に含まれる **EPC** や抗炎症性マクロファージの細胞特性を維持しながら増加させる生体外増幅培養法 (**Quality and Quantity culture: QQc**) が開発された (**Masuda et al. Stem Cells Transl Med. 2012**)。この方法によって採取された **EPC** や抗炎症性マクロファージを含む **MNC-QQc** を局所に投与することによって、糖尿病に伴う虚血性皮膚病変の創傷治癒が有意に促進したことも報告された (**Tanaka et al. Stem Cells Transl Med. 2018**)。このように、**MNC-QQc** の移植は次世代の血管再生・抗炎症治療として注目を集めている一方で、**PAH** に対する **MNC-QQc** 治療を検証した報告は未だなかった。そこで、研究代表者は **PAH** に対する **MNC-QQc** 投与による血管内皮機能の改善や抗炎症作用による抗血管リモデリング効果を検証することを目的として、本研究を行った。

3. 研究の方法

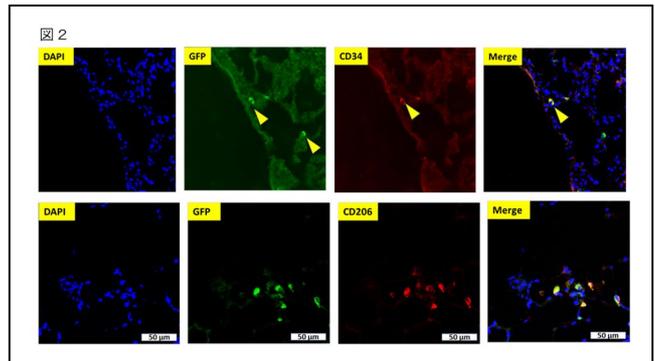
- (1) **MNC-QQc** 後の構成細胞の検証：ドナーラットから採取した末梢血単核球（**PBMNC**）と **MNC-QQc** の構成細胞の相違を、**FACS** を用いて比較検証した。
- (2) **PAH** ラットに対する **MNC-QQc** 移植の効果：**VEGF** 受容体拮抗薬と慢性低酸素曝露を誘導刺激として、**SD** ラットに **PAH** を誘導した。ドナーラット由来の **MNC-QQc** は、レシピエントラットの頸静脈から投与された。**PAH** 誘導刺激と共に **MNC-QQc** を静注する予防的投与、および誘導刺激から 3 週間経過し **PAH** が確立した時点で **MNC-QQc** を静注する治療的投与を行い、その後右心カテーテル検査による右室収縮期圧（**RVSP**）・右室肥大重量比（**RV/LV+Septum**）・小肺動脈のリモデリングを評価し、**MNC-QQc** 移植の **PAH** 進展への効果を検証した。
- (3) **MNC-QQc** 移植細胞の肺組織への定着：**GFP** 陽性ドナーラットから採取した **MNC-QQc** をレシピエントラットに投与し、一定期間後に肺組織を摘出した。蛍光免疫染色と **FACS** を用いて、肺内に定着した **GFP** 陽性細胞の細胞種を同定した。
- (4) **PAH** 病態改善における **MNC-QQc** 構成細胞の役割：**MNC-QQc** で増加していた **CD163** 陽性細胞（**M2** マクロファージ）/**CD34** 陽性細胞（**EPC**）が、**PAH** 改善効果に貢献している可能性があると考えた。そこで、それぞれの細胞を除去した **MNC-QQc** を **PAH** レシピエントラットに投与し、**PAH** の病態進展抑制におけるそれぞれの細胞の役割を検証した。
- (5) **MNC-QQc** による肺組織中の各種遺伝子発現の網羅的解析：コントロール（**CON**）・**PAH**・**PAH+MNC-QQc** の 3 群の全肺組織を用いて、それぞれの肺組織中の遺伝子発現を網羅的に検証し、**MNC-QQc** による **PAH** 進展抑制効果のメカニズムを検証した。

4. 研究成果

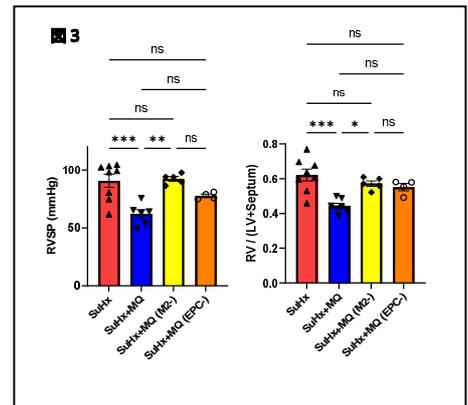
- (1) **MNC-QQc** 後の構成細胞の検証：**PBMNC** と比較して、**MNC-QQc** では **CD34** 陽性（**EPC**）、**CD163** 陽性（**M2** マクロファージ）の細胞割合が有意に増加していた。一方で、**iNOS** 陽性（**M1** マクロファージ）、**CD3/CD4/CD8** のいずれかが陽性（各種リンパ球）の細胞割合は減少していた。
- (2) **PAH** ラットに対する **MNC-QQc** 移植の効果：**MNC-QQc** の予防的・治療的投与のいずれにおいても、**PAH** ラットの **RVSP** と **RV/LV+Septum** の有意な抑制・改善効果を認めた。直径 50 μ m 以下の小肺動脈の増殖性内膜病変は、**MNC-QQc** 投与によって有意に減少していた（図 1）。
- (3) **MNC-QQc** 移植細胞の肺組織への定着：**GFP** 陽性ドナーラットから採取した **MNC-QQc** を治療的に投与した肺組織中では、血管周囲の間質に **GFP** 陽性細胞を認めた。**GFP** 陽性細胞の一部は **CD34** 陽



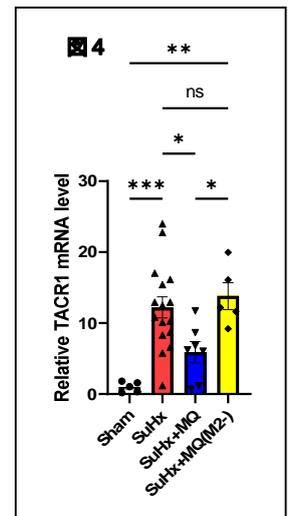
性であり、**EPC** が定着していることが示唆された。また、**GFP** 陽性細胞の多くが **CD206** を共発現しており、**MNC-QQc** の構成細胞のなかで、主に肺に定着したのは **M2** マクロファージであると考えられた。全肺組織を用いた **FACS** による検証でも、肺組織中の **GFP** 陽性/**CD68** 陽性のドナー由来のマクロファージのほとんどが、**CD163** 陽性 **M2** マクロファージであった (図 2)。



- (4) **PAH** 病態改善における **MNC-QQc** 構成細胞の役割: 蛍光免疫染色でレシipient肺への定着が観察された **M2** マクロファージと **EPC** について、それぞれの細胞除去した **MNC-QQc** を **PAH** レシipientラットに投与した結果、**M2** マクロファージ除去後の **MNC-QQc** では **PAH** 改善効果は消失し、**EPC** 除去後の **M2** マクロファージでは **PAH** 改善効果が減弱する傾向を認めた (図 3)。



- (5) **MNC-QQc** による肺組織中の炎症関連遺伝子の網羅的解析: **Inflammatory response** に関わる遺伝子発現を網羅的に検証すると、**CON** と比較して **PAH** で **45** 遺伝子の発現が増加しており、**PAH** と比較して **PAH+MNC-QQc** で **21** 遺伝子の発現が減少していた。さらに、**3** 群比較で増加/減少の動向を示したのは **16** 遺伝子あり、最も増減が大きかった遺伝子は **TACR-1** であった。**3** 群の全肺組織を用いた **PCR** においても、**TACR1-mRNA** の発現はマイクロアレイの結果と矛盾しない有意な増減を示した。さらにも、**M2** マクロファージを除去した **MNC-QQc** では、**PAH** と比較して **TACR-1** の **mRNA** の発現が減少しなかったことから、**MNC-QQc** に含まれる **M2** マクロファージが、**TACR-1** の発現を制御していることが示唆された (図 4)。



- (6) 今後の実験予定: **TACR-1** はニューロキニン **1** 受容体に発現する遺伝子で、サブスタンス **P** をリガンドとして、血管平滑筋の収縮やマスト細胞/マクロファージを介した炎症の惹起に参与する。今後は、蛍光免疫染色や **FACS** を用いて、**TACR-1** が発現している細胞を同定し、**MNC-QQc** がニューロキニン **1** 受容体を介した **PAH** の進展を抑制するメカニズムを検証する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	田中 里佳 (TANAKA RIKA) (70509827)	順天堂大学・医学部・教授 (32620)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関